

生防菌 *Alternaria amaranthi*-3 对反枝苋的防治效果

姜述君^{1,2} 杨云强² 石园园² 范文艳² 朱 丹¹ 戴凌燕¹

(1. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319; 2. 黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319)

摘要: 反枝苋 *Amaranthus retroflexus* 是一种世界性恶性杂草。为了确定微生物除草剂候选菌 *Alternaria amaranthi*-3 防除反枝苋的潜力, 通过盆栽试验研究了接种浓度、露期和水乳剂型对 *A. amaranthi*-3 菌株致病力的影响。结果显示, 接种浓度显著影响菌株的致病力, 在 48 h 露期条件下, 接种孢子浓度为 10^5 个/mL 时, 菌株水剂对反枝苋幼苗生长抑制率为 35.55%; 浓度为 10^7 个/mL 时, 生长抑制率达到 75.25%。露期对该菌株的致病力也有较大影响, 在不保湿条件下, 菌株水剂对反枝苋的生长抑制率为 26.43%, 而保湿 48 h 处理的生长抑制率达到 77.96%。Span 80: Tween 80 = 1:3 的复配乳化剂和大豆油制备的水乳剂可显著降低露期对菌株防效的影响和提高菌株的致病力, 无露期时, 菌株水乳剂对反枝苋的生长抑制率达到 88.35%, 显著高于水剂; 48 h 露期条件下, 菌株水乳剂处理的生长抑制率为 90.59%, 而菌株水剂处理为 77.96%。表明通过剂型的改进菌株 *Alternaria amaranthi*-3 能有效防除反枝苋。

关键词: *Alternaria amaranthi*-3; 水乳剂; 反枝苋; 微生物除草剂

Biocontrol efficiency of *Alternaria amaranthi*-3 to *Amaranthus retroflexus*

Jiang Shujun^{1,2} Yang Yunqiang² Shi Yuanyuan² Fan Wenyan² Zhu Dan¹ Dai Lingyan¹

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, Heilongjiang Province, China; 2. College of Agronomy, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, Heilongjiang Province, China)

Abstract: Redroot pigweed, *Amaranthus retroflexus*, is a notorious weed worldwide. To evaluate the potential of *Alternaria amaranthi*-3 as a mycoherbicide for redroot pigweed control. The effect of inoculum potential, dew period and formulation of emulsions in water (EW) on the pathogenicity of *A. amaranthi*-3 was studied using pot experiment. The result showed that the inoculum potential significantly affected the pathogenic efficiency. When the redroot pigweed was inoculated with 1×10^5 spore/mL, the strain spore in aqueous formulations inhibited the growth of redroot pigweed at 35.55%. The inhibition of the aqueous formulation against redroot pigweed growth arrived 75.25% at 1×10^7 spore/mL concentration. The pathogenicity of the strain was dependent on the dew period. Without a dew period, aqueous formulation of strain provided the inhibition rate of 26.43%. In 48 h dew period, the aqueous formulation of strain can provide the inhibition rate of 77.96%. The EW significantly enhanced the pathogenicity of the strain and reduced the requirement of dew period for maximum weed control. In the absence of dew, the biocontrol potential of the EW formulation is better than that of aqueous formulation, the inhibition rate was 88.35% and 26.43% respectively. In 48 h dew period, EW formulation and aqueous formulation inhibited the growth of redroot pigweed at 90.59% and 77.96% respectively. These results indicated that

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目 (GC05B205)

作者简介: 姜述君, 男, 1968 年生, 副教授, 研究方向为植物学与杂草生物防治, email: jsjfwy@sohu.com

收稿日期: 2009-04-16

when *A. amaranthi*-3 was properly formulated, *A. amaranthi*-3 can be effective for controlling redroot pigweed.

Key words: *Alternaria amaranthi*-3; emulsion in water; *Amaranthus retroflexus*; mycoherbicide

反枝苋 *Amaranthus retroflexus* 又称野苋菜或西风谷,原产于美洲,是世界性分布的一种恶性杂草,19 世纪中叶在我国河北和山东两省发生,现已遍布全国。该杂草主要危害大豆、玉米、小麦、棉花和蔬菜等旱田作物,其生长速度快、植株个体大,常与农作物争夺光、肥和水分,抑制作物生长,在我国暖温带地区危害较严重,危害面积占农作物种植面积的 36%,且即使在低密度下亦可造成严重的产量损失^[1-2]。李晓晶等^[3]研究表明,反枝苋严重危害时可造成甜菜减产 49%、大豆减产 22%。Brigida 等^[4]研究表明,反枝苋还可通过产生倍半萜烯类物质抑制作物的生长。目前,化学防除是治理反枝苋危害的主要措施,据报道,反枝苋已对莠去津(atrazine)、利谷隆(linuron)^[5]、噻草酮(metribuzin)^[6]、甲嘧磺隆(sulfometuron-methyl)^[7]、咪草烟(imazethapyr)和噻吩磺隆(thifensulfuron(methyl))^[8]等除草剂产生抗药性,防除难度进一步增大。此外,化学除草剂的使用也易导致污染环境。因此,有关开发防除反枝苋的微生物除草剂的研究倍受关注。Ghorbani 等^[9]对 *Alternaria alternata* 防除反枝苋效果进行了评价。Ortiz-Ribbing & Williams^[10]研究表明, *Phomopsis amaranthicola* 和 *Microsphaeropsis amaranthi* 不仅可以有效防除反枝苋,还可以用于防除苋属其它杂草。反枝苋生防菌 *Alternaria amaranthi*-3 是本实验室从大豆田反枝苋 *A. retroflexus* 病叶中分离到的一个微生物除草剂候选菌,关于利用该菌防除反枝苋的研究尚未见报道。微生物除草剂主要是利用真菌孢子或无性繁殖体侵染寄主杂草,将其控制在经济危害允许水平。大量研究表明,通过剂型的改进可以有效降低露期对微生物除草剂的影响,显著提高其应用效果^[9, 11-12]。由于生防菌 *A. amaranthi*-3 对露期也有较高的要求,因此,本研究对生防菌 *A. amaranthi*-3 的致病力以及水乳剂克服露期对菌株致病力的限制作用进行了评价,以期为生防菌 *A. amaranthi*-3 的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:反枝苋专化链格孢菌株 *Alternaria amaranthi*-3。供试植物:反枝苋 *Amaranthus retroflex-*

us。助剂:机油、柴油和煤油,大庆炼化公司提供;植物油:菜籽油和芝麻油,营口渤海油脂工业有限公司生产;大豆油,黑龙江九三油脂有限责任公司生产。试剂:Span 80,沈阳东兴试剂厂;Tween 80,天津河口区红岩试剂厂;黄原胶,河北智通化工有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株和孢子培养

将 4℃ 下保存的菌株 *Alternaria amaranthi*-3 转接到 PDA 培养基上,28±1℃ 恒温黑暗条件下培养 7 天,取边缘、生长旺盛的菌丝块作为接种体。用 PDA 平板接种菌株,在 28±1℃、20 W 黑光灯(波长 365 nm、距离 40 cm)下,每天照射 12 h,培养 7 天后用玻片在培养基表面刮取孢子,用无菌水冲洗过滤,收集孢子滤液配成孢子浓度为 2×10⁸ 个/mL 的悬浮母液。

1.2.2 水乳剂体系的确立

油剂的筛选:将分生孢子与各种油剂混合配制孢子悬浮液,孢子浓度为 10³ 个/mL,采用悬滴法测定油剂对孢子萌发的影响。在 25℃ 恒温条件下分别培养 4、8 h。孢子萌发情况用 OLYMPUS CX21 显微镜在 10×40 倍下观察,每次观察 4 个视野,每视野内的孢子数量为 100~300 个。4 次重复,以分生孢子在水溶液中萌发数量为对照。

油-水体系亲水疏水平衡值(HLB)的测定:用标准乳化剂 Span 80 和 Tween 80 配成不同 HLB 值的复配乳化剂系列。Span 80 与 Tween 80 质量比分别为 1:2 (HLB=11.43)、1:2.5 (HLB=11.94)、1:3 (HLB=12.30)、1:4 (HLB=12.86)、1:5 (HLB=13.23)、1:7 (HLB=13.60)。复配乳化剂质量分数为 0.2%,油水比例为 0.085:1,总体积为 100 mL,稳定剂黄原胶加入量为 0.06%。将亲油乳化剂 Span 80 和分生孢子粉加入油中,将亲水乳化剂 Tween 80 加入水中,分别摇匀,混合后加入稳定剂黄原胶,然后进行乳化,静置 3 h 后测定其浮油量。复配乳化剂 HLB 值计算公式为: $H(AB) = H(A) \times w(A) + H(B) \times w(B)$,其中,A 和 B 为纯表面活性剂, $H(AB)$ 为混合表面活性剂的亲水亲油强度平衡值, $H(A)$ 、 $H(B)$ 分别为亲水亲油强度平衡值, $w(A)$ 、 $w(B)$ 分别为混合表面活性剂中 A 与 B 的质量分数。

1.2.3 菌株对反枝苋的致病性测定

精选的反枝苋种子用 0.1% HgCl 浸泡 8 min, 然后用蒸馏水冲洗 4~5 次。选取 20 粒种子均匀摆放在装有灭菌营养土的营养钵内, 营养钵置于人工气候箱 (PYX-800Q-B) 中, 光照时间 14 h、光照强度 3000 lx、温度 28 ℃。反枝苋长至 2~3 叶期时分别用水剂 (孢子悬浮液中加入 0.2% Tween 80) 和水乳剂喷雾接种, 孢子浓度分别为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 和 1×10^8 个/mL, 喷液量为 120 mL/m², 保湿 48 h, 然后移到温室中生长。接种 14 天后, 调查反枝苋幼苗发病情况, 测定幼苗鲜重, 每处理 4 次重复。

生长抑制率 (%) = (1 - 处理幼苗鲜重/对照幼苗鲜重) × 100

1.2.4 露期对菌株致病性的影响

反枝苋幼苗长至 2~3 叶期时分别用水剂和水乳剂喷雾法接种, 孢子浓度为 1×10^7 个/mL, 喷液量为 120 mL/m²。接种保湿 0、6、12、24 和 48 h 后,

将盆栽苗移到温室内进行培养。接种 14 天后, 调查反枝苋幼苗发病情况, 测定幼苗鲜重, 每处理 4 次重复。计算生长抑制率。

1.3 数据分析

采用 SPSS 8.0 统计软件分析不同处理间的差异显著性和相关性。

2 结果与分析

2.1 水乳剂体系的确立

2.1.1 油剂的筛选: 生防菌 *A. amaranthi*-3 分生孢子在植物油中的萌发率明显高于其在矿物油中; 在大豆油和菜籽油中 8 h 萌发率分别为 68.14% 和 67.93%, 高于无菌水对照; 在芝麻油中 8 h 萌发率为 62.19%, 略低于对照; 在柴油中的萌发率最低, 8 h 萌发率仅为 41.14%, 在机油和煤油中略高, 但 3 种矿物油处理间差异不显著 (表 1)。

表 1 油剂对 *Alternaria amaranthi*-3 分生孢子萌发的影响

Table 1 Germination percentage of *Alternaria amaranthi*-3 in different oil formulations

处理 Treatment	4 h 萌发率 (%) Germination of 4 h	8 h 萌发率 (%) Germination of 8 h	处理 Treatment	4 h 萌发率 (%) Germination of 4 h	8 h 萌发率 (%) Germination of 8 h
大豆油 Bean oil	36.21 ± 0.37 A	68.14 ± 1.51 A	机油 Lubricating oil	16.41 ± 0.44 D	43.66 ± 1.78 CD
芝麻油 Gingeli oil	27.00 ± 1.45 B	62.19 ± 1.16 B	煤油 Coal oil	20.62 ± 1.21 C	47.64 ± 1.65 C
菜籽油 Colza oil	36.67 ± 1.22 A	67.93 ± 1.42 AB	对照 CK	35.14 ± 1.56 A	65.47 ± 1.92 AB
柴油 Diesel oil	16.08 ± 0.30 D	41.14 ± 2.35 D			

注: 表中数据为 4 次重复的平均值 ± SD, 同列中不同字母表示在 0.01 水平差异显著。Note: Data are the means ± SD of 4 replicates, the different letters in the same column indicate statistically significant difference at 0.01 level.

2.1.2 乳化剂的确定: 复配乳化剂的乳化效果一般较单一乳化剂好, 因此, 以常用非离子表面活性剂 Span 80 和 Tween 80 作乳化剂, 进行复配。结果表明, Span 80 与 Tween 80 质量比分别为 1:3 (HLB = 12.30) 和 1:4 (HLB = 12.86) 的复配乳化剂的乳化效果最好, 乳液体系不分层, 表面呈乳白色, 无浮油出现。由于 Span 80 的价格较 Tween 80 低廉, 因此, 最终确定以 Span 80: Tween 80 = 1:3 的配方作为微生物除草剂的复配乳化剂。用该复配乳化剂制备的微生物除草剂水乳剂效果较好, 菌株 *A. amaranthi*-3 的分生孢子可以很好地包埋于油中 (图 1)。

2.2 *Alternaria amaranthi*-3 对反枝苋的致病性

反枝苋幼苗的发病严重程度与孢子浓度呈正相关, R^2 分别为 0.9022 和 0.9363, 随着孢子浓度增加反枝苋的发病程度加重。孢子浓度为 10^5 个/mL 时,

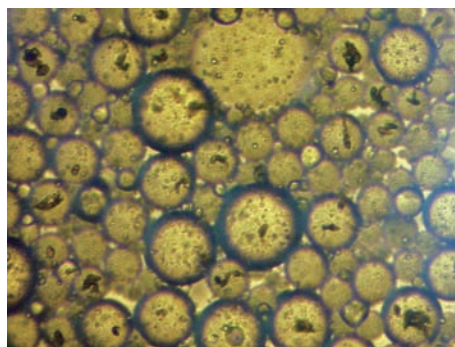


图 1 乳剂包埋孢子效果的显微观察

Fig. 1 Microexamination of emulsion-embedded spore

水剂和水乳剂对反枝苋幼苗生长抑制率分别为 35.55% 和 46.31%; 当孢子浓度达到 10^7 个/mL 时, 两种剂型对反枝苋幼苗生长抑制率分别达 75.25% 和 88.86%, 极显著高于其它低浓度处理 ($P < 0.01$);

孢子浓度进一步提高到 10^8 个/mL 时,水剂和水乳剂对反枝苋幼苗生长抑制率增加不明显,仅为 78.73% 和 89.53%。此外,接种孢子浓度为 10^7 个/mL 的水乳剂处理,生长抑制率为 88.86%,比 10^8 个/mL 水剂处理的生长抑制率高 10.13% (图 2)。表明 10^7 个/mL 的孢子浓度是生防菌株 *A. amaranthi*-3 的适宜浓度,而且使用水乳剂型可显著提高菌株对反枝苋的致病性。

图 2 孢子浓度对 *Alternaria amaranthi*-3 致病性的影响

Fig. 2 Effect of conidium concentration on the pathogenicity of *Alternaria amaranthi*-3

2.3 露期对菌株致病性的影响

A. amaranthi-3 水剂受露期影响较大,其防效随露期的延长而增强,在不保湿条件下,水剂对反枝苋的生长抑制率为 26.43%;保湿 48 h,抑制率达 77.96%。在不保湿条件下,水乳剂对反枝苋生长的抑制率达到 88.35%,为水剂的 3.4 倍;保湿 48 h,抑制率为 90.59%,水乳剂不保湿处理和保湿处理间差异不显著 ($P < 0.01$) (图 3)。表明水乳剂能克服露期对生防菌株 *A. amaranthi*-3 致病力的限制作用,显著提高了菌株对反枝苋的防除效果。

3 讨论

保持足够的接菌量是微生物除草剂发挥作用的一个重要因素。不同生防菌的生物学特性和防治对象不同,在实践中接种量有较大差异。如疣孢漆斑菌 *Myrothecium verrucaria* 有效防除野葛 *Pueraria lobata* 的孢子浓度为 10^7 个/mL^[13];姜述君等^[14]研究表明,狭卵链格孢菌 *A. augustiovoidea* AAEC05-3 菌株接菌量达到 10^6 个/mL 时,对稗草幼苗生长抑制率可达 85%。本研究结果表明,菌株 *A. amaranthi*-3

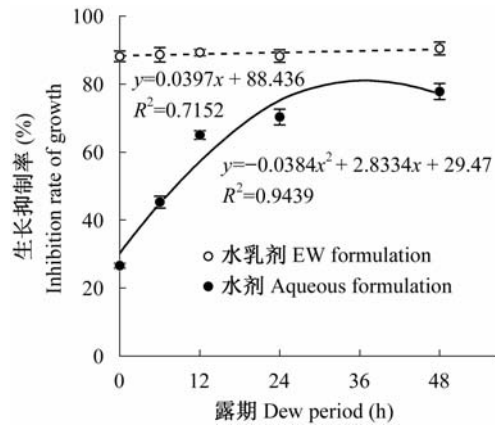


图 3 露期对 *Alternaria amaranthi*-3 致病性的影响

Fig. 3 The effect of dew period duration on the pathogenicity of *Alternaria amaranthi*-3

对反枝苋的生长抑制率均受孢子浓度的影响,在孢子浓度为 1×10^7 个/mL 时,两种剂型对反枝苋的防效分别为 75.25% 和 88.86%。这一研究结果说明水乳剂型可以显著提高菌株 *A. amaranthi*-3 的防效。当浓度增加到 1×10^8 个/mL 时,水剂和水乳剂防效增加幅度均不大,统计分析结果显示, 1×10^8 个/mL 浓度处理与 1×10^7 个/mL 浓度处理间差异不显著,其原因可能与孢子萌发自抑制作用或附着孢形成有关。许多植物病原真菌具有自抑制孢子萌发和附着孢形成的现象,即当分生孢子浓度过高时,分生孢子萌发和附着孢形成受到抑制^[15]。*A. amaranthi*-3 是否也存在这种现象,还有待进一步探讨。

微生物除草剂是利用植物病害流行病学原理防除目标杂草,施用时对环境要求较为苛刻。在各种环境因子中,露水持续时间与空气湿度是影响生防菌孢子萌发、入侵、孢子产生及再侵染的主要因子,并直接影响微生物除草剂的防效。微生物除草剂剂型的改进显著提高其对目标杂草的防除效果,如平头炭疽菌孢子水剂对大麻田菁防效不足 10%,而该菌的逆乳液剂型防效可达 96%^[16]。许多研究表明,水乳剂可显著提高微生物除草剂的防效。Zhang & Watson^[17]采用水乳剂使尖角突脐孢菌 *Exserohilum monoceras* 对稗草的防效达 90% 以上;Boyette 等^[18]研究认为,在田间试验条件下,刺盘孢 *Colletotrichum truncatum* 水乳剂对大豆田杂草大麻田青 *Sesbania exaltata* 防效可达 95%;Hoagland 等^[19]研究显示,疣孢漆斑菌 *M. verrucaria* 的水乳剂对葛藤 *P. lobata* 防效接近 100%。本研究结果表明,虽然生防菌株 *A. amaranthi*-3 对反枝苋有较强的致病力,但露期对该菌防除反枝苋的效果影响较大,剂型改进试验发

现,水乳剂可以显著降低这种影响,并改善菌株 *A. amaranthi*-3 的性能。水乳剂能提高菌株 *A. amaranthi*-3 防效的原因主要是由于菌株孢子被油所包裹从而降低了孢子受外界环境影响的程度,另外还可能与大豆油促进该菌株孢子萌发有关。有研究表明,植物油不仅可以促进生防菌的孢子萌发,还可以促进附着孢的形成,如植物油可以促进刺盘孢 *C. truncatum*^[18] 和疣孢漆斑菌 *M. verrucaria*^[20]。本试验结果表明,大豆油和菜籽油均可促进菌株 *A. amaranthi*-3 的孢子萌发,但大豆油和菜籽油是否能促进菌株 *A. amaranthi*-3 的附着孢形成,还有待进一步研究。由于菜籽油粘稠度较大,不利于喷洒,因此,本研究最终选用大豆油作为 *A. amaranthi*-3 孢子粉喷洒介质。

参 考 文 献 (References)

- [1] 唐洪元. 中国北纬 26° 农田杂草的经相分布和危害. 杂草学报, 1987, 1(2): 8 - 10
- [2] 倪汉文, 张丽, 陈勇, 等. 夏玉米地杂草为害的产量损失模型. 植物保护学报, 2000, 27(2): 163 - 167
- [3] 李晓晶, 张宏军, 倪汉文. 反枝苋的生物学特性及防治. 农药科学与管理, 2004, 258(3): 13 - 15
- [4] Brigida D A, Paolo D M, Marina D G, et al. Amarantholidols and amaratholidosides; new nerolidol derivatives from the weed *Amaranthus retroflexus*. Tetrahedron, 2006, 62(4): 640 - 646
- [5] Dabaan M E, Garbutt K. Herbicide cross-resistance in atrazine resistant velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*). Proceedings of the Second International Weed Control Congress, Copenhagen, Denmark, 1996: 505 - 510
- [6] Vasilakoglou I B, Dhima K V. Metribuzin resistance in *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium album* in Greece. Weed Science, 2000, 48(1): 69 - 74
- [7] Sibony M, Michel A, Haas H U, et al. Sulfometuron-resistant *Amaranthus retroflexus*: cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Weed Research, 2001, 41(6): 509 - 522
- [8] McNaughton K E, Letarte J, Lee E A, et al. Mutations in *ALS* confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). Weed Science, 2005, 53(1): 17 - 22
- [9] Ghorbani R, Seel W, Litterick A, et al. Evaluation of *Alternaria alternate* for biological control of *Amaranthus retroflexus*. Weed Science, 2000, 48(4): 474 - 480
- [10] Ortiz-Ribbing L, Williams M M. Potential of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi*, as bioherbicides for several weedy *Amaranthus* species. Crop Protection, 2006, 25(1): 39 - 46
- [11] Sandrin T R, TeBeest D O, Weidemann G J. Soybean and sunflower oils increase the infectivity of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* to northern jointvetch. Biological Control, 2003, 26(3): 244 - 252
- [12] Millhollon R W, Berner D K, Paxson L K, et al. *Myrothecium verrucaria* for control of annual morningglories in sugarcane. Weed Technology, 2003, 17(2): 276 - 283
- [13] Boyette C D, Walker H L, Abbas H K. Biological control of kudzu (*Pueraria lobata*) with an isolate of *Myrothecium verrucaria*. Biocontrol Science and Technology, 2002, 12(1): 75 - 82
- [14] 姜述君, 范文艳, 鞠世杰, 等. 狭卵链格孢菌株 AAEC05-3 及其毒素对稗草的致病性. 植物保护学报, 2007, 34(3): 283 - 288
- [15] Meyer W L, Bernd S W, Beck A K, et al. Revised structure of the fungal germination self-inhibitor gloeosporone. Helvetica Chimica Acta, 1987, 70(2): 281 - 291
- [16] Boyette C D, Quimby P C, Bryson C T, et al. Biological control of hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) under field conditions with *Colletotrichum truncatum* formulated in inverted emulsion. Weed Science, 1993, 41(3): 497 - 500
- [17] Zhang W, Watson A K. Efficacy of *Exserohilum monoceras* for the control of *Echinochloa* species in rice (*Oryza sativa*). Weed Science, 1997, 45(1): 144 - 150
- [18] Boyette C D, Hoagland R E, Weaver M A. Biocontrol efficacy of *Colletotrichum truncatum* for hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) is enhanced with unrefined corn oil and surfactant. Weed Biology and Management, 2007, 7(1): 70 - 76
- [19] Hoagland R E, Boyette C D, Abbas H K. *Myrothecium verrucaria* isolates and formulations as bioherbicide agents for kudzu. Biocontrol Science and Technology, 2007, 17(7): 721 - 731
- [20] Walker H L, Tilley A M. Evaluation of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from sicklepod (*Senna obtusifolia*) as a potential mycoherbicide agent. Biological Control, 1997, 10(2): 104 - 112